昆虫细胞免疫反应中的吞噬、集结和包囊作用

吴 姗, 凌尔军*

(中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所昆虫科学研究中心, 上海 200032)

摘要: 细胞免疫是昆虫天生免疫系统中很重要的部分, 包括了由血细胞介导的一系列吞噬、集结和包囊等作用。本文讨论了近年来在昆虫细胞免疫方面的研究进展, 包括参与昆虫细胞免疫的血细胞类型, 识别外来异物的受体因子, 影响免疫活性的一些酶和化学物质等。另外还就吞噬模式, 以及集结和包囊过程中粘附态细胞的形成等加以讨论。

关键词: 昆虫; 免疫反应; 细胞免疫; 血细胞; 吞噬; 集结; 包囊

中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2009)07-0791-08

Phagocytosis, nodulation and encapsulation in cellular immune responses in insects

WU Shan, LING Er-Jun* (Center for Insect Science, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: Cellular immunity that includes phagocytosis, nodulation and encapsulation mediated by hemocytes is a very important part of the innate immune system in insects. In this article we reviewed the current understanding of cellular immune responses in insects. We summarized the hemocyte types involved in cellular immunity, some cellular receptors that recognize different microbes and multicellular parasites, and some enzymes and chemicals that can affect the immune activity. We also discussed the modes of hemocyte-mediated phagocytosis and the morphological change of hemocytes during the progress of nodulation and encapsulation.

Key words: Insect; immune response; cellular immunity; hemocytes; phagocytosis; nodulation; encapsulation

在脊椎动物中, 防御感染的机制可分为天生免疫(innate immunity)和获得性免疫(adaptive immunity)两种。但无脊椎动物却只受天生免疫的保护(Hoffmann, 2003)。入侵的微生物进入体腔后, 会被昆虫的天生免疫受体[被称为模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)]识别, 从而开始一系列的免疫反应。识别异己的过程是一个昆虫免疫受体和微生物的一些分子结构[被称为pathogen associated molecular patterns (PAMPs)]相互作用的过程。这些分子结构包括细菌的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、肽聚糖(peptidoglycan, PGN)、脂磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA)和真菌的β-1,3-葡聚糖(β-1,3- glucans)等。当这些分子信号被昆虫的免疫受体捕获后, 触发了包括体液免疫(humoral immunity)和细胞免疫(cellular immunity)在内的一系列免疫反应。

体液免疫包括了能诱导抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)产生的Toll和Imd的反应通道; 以及由原多酚氧化酶(prophenoloxidase, ProPO)等一系列酶参与的凝结(coagulation)和黑化反应(melanization)(Christensen *et al*., 2005)。细胞免疫则主要依赖血细胞对外来抗原或异物的吞噬(phagocytosis)、集结(nodulation)和包囊(encapsulation), 主要由浆细胞(plasmatocyte)、粒细胞(granulocytes)和拟绛色细胞(oenocytoids)等参与完成(Hillyer and Christensen, 2002; Hillyer *et al*., 2003a)。简单地将昆虫的天生免疫分为体液免疫和细胞免疫, 似乎有些武断(Lavine and Strand,

基金项目: 中国博士后科学基金(20070420680); 上海市博士后科研资助计划项目(07R214152); 中国高技术研究发展计划项目(2006AA10A119); 国家"973"计划项目(2007CB513107)

作者简介: 吴姗, 女, 1976年生, 博士后, 主要从事昆虫天生免疫方面的研究

*通讯作者 Author for correspondence, E-mail: lingerjun@gmail.com

收稿日期 Received: 2008-11-05; 接受日期 Accepted: 2009-06-03

2002；Strand，2008），很多体液因子都会影响血细胞的功能，同样黑化作用所需要的一系列酶都在血细胞和/或脂肪体细胞产生中产生，且其作用的结果是导致外来入侵微生物被包囊（encapsulation），因此也有人将黑化反应作为细胞免疫的一部分（Söderhäll and Cerenius，1998；Theopold *et al.*，2002）。

1 吞噬作用

1.1 参与吞噬作用的血细胞

吞噬作用是进化上保守的用于清除入侵的病原体和细胞凋亡残体的机制，这个过程由单个细胞完成，包括识别、吞噬、对入侵病原体的破坏和细胞本身的衰竭死亡等步骤，无论在天生免疫和获得性免疫中都扮演了很重要的角色（Blandin and Levashina，2007 ；Williams，2007）。在果蝇的幼虫中，血细胞的种类可以分为浆细胞（plasmatocyte）、叶状细胞（lamellocyte）和晶体细胞（crystal cell），但只有浆细胞在成虫中保留（Lanot *et al.*，2001）。而果蝇的吞噬过程主要由浆细胞完成，作用相当于哺乳动物中的巨噬细胞（macrophage）（Williams，2007）。成蚊的血细胞分为类绛色细胞（oenocytoid）、原血细胞（prohemocyte）和粒细胞（granulocyte），但只有粒细胞具有吞噬异物的能力（Castillo *et al.*，2006）。粒细胞占了大约成虫血细胞总量的90%，当有异物入侵时，这些细胞立即靠拢并粘附，并迅速形成丝状伪足进行吞噬（Castillo *et al.*，2006）。长红猎蝽 *Rhodnius prolixus* 的 5 龄幼虫中含有原血细胞、浆细胞、粒细胞、类绛色细胞和脂血细胞（adipohemocyte）。和果蝇一样，参与吞噬的只有浆细胞，且浆细胞在血细胞内所占比例会随着外来异物的入侵而呈现上升趋势，而同时原血细胞所占比例下降（Borges *et al.*，2008）。原血细胞一般存在于造血器官和血淋巴中，并被一些作者（Ling *et al.*，2005）认为是一类干细胞，而其他血细胞由此分化而来，因此也导致了吞噬作用时蟒象中两种细胞的增减（Borges *et al.*，2008）。红头丽蝇 *Calliphora vicina* 幼虫的吞噬作用和果蝇、蚊不同，有 3 类血细胞参与了吞噬过程，包括拟血小板（thrombocytoid）、幼虫浆细胞（larval plasmatocyte）和浆细胞Ⅰ（plasmatocyte Ⅰ）（Kind，2005）。将无生物活性的微粒注入血淋巴后，拟血小板最快对外来物作出反应，根据幼虫的虫龄不同，在注射后的 0.5 ~ 5.0 min 内对外来物进行吞噬。浆细胞能附着在外来颗粒的表面，并形成桑葚体（morule），最后将异物吞没。附着的过程大约在异物进入血淋巴后的 5 ~ 10 min 内开始，而吞噬的过程则在这之后的 1 ~ 3 h 才能被观察到；一般，虫龄大，反应时间较快，吞噬能力也较大（Kind，2005）。

1.2 吞噬模式

根据异物被细胞吞噬的方式不同和识别异物的受体不同，可以将吞噬作用分为若干种（Swanson and Baer，1995）。在由 Fc 受体介导的拉链式吞噬（zippering phagocytosis）模式中，细胞表面伸出板状伪足，形成吞噬体，并紧紧粘附异物。在由补体受体（complement receptors）介导的促发式吞噬（triggering phagocytosis）模式中，异物微粒被陷入细胞或吞噬体的膜内，而并不像拉链式那样紧紧粘附。另一种形态上有差异的机制被称为是“胞饮（macropinocytosis）”现象，此类吞噬模式可以是非受体依赖型的（receptor-independent），也可以是激动蛋白依赖型的（actin-dependent）。胞饮现象伴随着细胞边缘的波动能形成较大的吞噬体，不仅能吞噬外来异物颗粒，还能吞噬一定胞外液（Swanson and Baer，1995；Kind，2005）。当革兰氏阳性和阴性菌侵染棉贪夜蛾 *Spodoptera littoralis* 时，这 3 种吞噬模式都有被发现（Costa *et al.*，2005）。长红猎蝽 *R. prolixus* 的浆细胞首先是通过拉链模式对细菌进行吞噬反应的，而对非活性的乳胶颗粒则是以触发式进行吞噬的，而胞饮现象在吞噬上述两种外来异物时都有发生（Borges *et al.*，2008）。

1.3 对不同外源异物的吞噬反应

对不同的异物，吞噬反应也有所不同。冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 的细胞系 5.1* 对革兰氏阴性菌大肠杆菌 *Escherichia coli* 的吞噬速度要快于对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 的吞噬速度（Levashina *et al.*，2001；Moita *et al.*，2006；Blandin and Levashina，2007）。观察埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 血细胞免疫时的超微结构发现，大多数的大肠杆菌和疟原虫孢子体 *Plasmodium sporozoite* 都被吞噬，而革兰氏阳性菌——藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* 则多被黑化，黑化后的菌有的能再被粒细胞吞噬（Hillyer *et al.*，2003b），但在冈比亚按蚊中很少有细菌被黑化的情况发生（Blandin and Levashina，2007）。长红猎蝽 *R. prolixus* 的浆细胞能够吞噬大肠杆菌，也能使其黑化，但对金黄色葡萄球菌却显示了很强的黑化作用（Borges *et al.*，

2008）。吞噬作用对革兰氏阳性菌和阴性菌的差异，主要体现在吞噬速度的不同和每个细胞吞噬细菌的个数不同（吞噬金黄色葡萄球菌较少），但造成差异的原因并不十分清楚，可能是由于介导两种菌的免疫信号通路不同引起，或者是两种菌内在本质（体积大小、PAMPs、诱导因子等等）不同引起，或者是两者结合的结果（Blandin and Levashina, 2007）。但有研究者（Hillyer *et al.*, 2004）分别用4种革兰氏阳性菌和4种革兰氏阴性菌感染埃及伊蚊时发现，这种细菌引起的吞噬和黑化的差异和革兰氏阴阳性无关。

1.4 吞噬作用的识别受体和调节因子

吞噬作用的形成，首先要依赖一些能识别异物的受体，包括补体因子（complement-like factors）、病原体识别受体（pathogen-recognition receptors）、细胞骨架蛋白（cytoskeletal proteins）等。在哺乳动物和昆虫中，表面受体的激活可以诱导细胞间的信号通路，从而达到细胞质重塑所需要的细胞质内化、吞噬小体的成熟和粒子溶解（Williams, 2007）。

含硫代酸酯的蛋白（thioester-containing proteins）TEP1是第一个被研究的参与吞噬过程的基因，与脊椎动物中的补体因子（complement factors）以及泛蛋白酶抑制剂 α_2-巨球蛋白（pan-protease inhibitors α_2-macroglobulins, α_2Ms）有很高的相似性（Blandin and Levashina, 2007）。当革兰氏阳性和阴性菌侵入冈比亚按蚊 *A. gambiae* 体内时，TEP1就是通过硫代酸酯键（thioester bond）附着到细菌表面，进而实现吞噬作用（Levashina *et al.*, 2001）。用dsRNA的方法使冈比亚按蚊细胞系5.1*中的TEP1的表达受到抑制，或使用甲胺使所有硫代酸酯键失活，这些处理使吞噬大肠杆菌的能力下降50%（Levashina *et al.*, 2001）。除了TEP1，又发现TEP2和TEP3对吞噬细菌也都是必要的（Moita *et al.*, 2005）。果蝇的基因组也含有能编码含有6个硫代酸酯（thioester）的补体相关蛋白（TEP）。最近，有研究表明TEP2参与了果蝇吞噬大肠杆菌的过程，而TEP3是吞噬金黄色葡萄球菌所必须的（Stroschein-Stevenson *et al.*, 2006）。

果蝇中的净化受体（scavenger receptor, SR）dSR-CI参与了外来细菌的识别，类似与哺乳动物中的A类SR，将dSR-CI的基因沉默，对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的吞噬能力下降（Rämet *et al.*, 2001）。进一步的实验表明，肽聚糖识别蛋白LC（peptidoglycan recognition protein LC, PGRP-LC）能在吞噬革兰氏阴性菌的时候起识别作用，但对革兰氏阳性菌却无能为力（Rämet *et al.*, 2002）。

Srp 基因是在吞噬作用和血细胞分化过程中必要的一个转录因子，Kocks等（2005）通过RNAi使 *Srp* 沉默后，删选到了46个相关的基因，再一一对这些基因敲除删选，发现一个被命名为“*eater*”的基因很明显地参与了大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的吞噬过程。当 *eater* 的转录过程被抑制后，S2细胞的吞噬能力降低了70%。*eater* 在果蝇幼虫的浆细胞中表达，失去 *eater* 后，对某些细菌的吞噬能力下降了80%。*eater* 被认为是编码一个跨膜蛋白的受体，在其胞外部分含由32个类似EGF重复序列（EGF-like repeat）组成。这是首个类似EGF重复序列受体被认为参与了微生物的识别。与净化受体相似，Eater蛋白可识别的微生物病原体的范围较广。

最近有研究表明，若果蝇的Ig超级家族受体——唐氏综合症细胞粘附分子（Down syndrome cell adhesion molecule, Dscam）能结合到细菌上，则能有效地诱导浆细胞发生吞噬反应（Watson *et al.*, 2005）。由于剪切位点的差异，Dscam能产生大约38 000种胞外结构具有显著差异的异构体。其中，有近18 000种异构体在脂肪体（fat body）细胞和血细胞中表达，部分有结合大肠杆菌的能力（Watson *et al.*, 2005）。蚊子的Dscam基因 *AgDscam*，结构也很复杂，能产生超过31 000种的剪切异构体；当蚊子受到微生物的感染后，随即可产生病原体特异性的异构体；若降低 *AgDscam* 的表达，蚊子对细菌和疟原虫的抵抗能力都明显下降（Dong *et al.*, 2006）。但是什么机制在调节Dscam产生病原体特异性的剪切体还不十分清楚。

此外，整联蛋白（integrin）也被认为是一类有识别能力的蛋白。在哺乳动物中，一些整联蛋白，如CD11b/（CD18），能识别细菌表面的脂多糖（Relman *et al.*, 1990）。但在果蝇中发现的并已探明功能的整联蛋白都没有识别外来异物的功能，而只对发育起调节作用（Hynes and Zhao, 2000）。冈比亚按蚊 *A. gambiae* 中的 β_2-整联蛋白（β_2-integrin, BINT）是一跨膜受体蛋白，并不直接识别外来入侵物，而是将TEP1等传来的信号传入细胞内，引起免疫反应（Blandin and Levashina, 2007）。将地中海实蝇 *Ceratitis capitata* 整联蛋白中的识别序列（recognition sequence Arg-Gly-Asp, RGD）除去，血细胞对大肠杆菌的吞噬能力明显下降（Foukas *et al.*, 1998）。

CED2，CED5 和 CED6 是一类胞内分子，参与了凋亡和坏死细胞的吞噬过程。在冈比亚按蚊 *A. gambiae* 中，负责接收由跨膜蛋白——β-2 整联蛋白传来的信号，诱导细胞进行吞噬作用。若将 CED5 或者 CED6 中的任意一个沉默掉，冈比亚按蚊对革兰氏阳性菌和阴性菌的吞噬效率都将降低 50%；若同时将它们沉默，则吞噬效率下降 80%。这也说明 CED5 和 CED6 属于两个不同的功能群，但都能促进吞噬作用（Moita *et al.*，2005）。

2 集结和包囊作用

2.1 参与集结和包囊作用的细胞

集结是指很多血细胞粘附、聚集在细菌等外来物的表面，而包囊实质上是和集结相同的过程，只是包囊的对象体积更大，包括线虫等寄生性外来入侵物（Ratcliffe and Gagen，1976，1977）。与吞噬作用不同，集结和包囊是血细胞在目标周围层层叠加形成一个“鞘”将异物包围住。如用电子显微镜观察大头金蝇 *Chrysomya megacephala* 幼虫注射酵母后的血细胞集结反应，大约注射后 2 h 有“集结”开始形成，12 h 后，在酵母和细胞碎片周围可以观察到一层由血细胞组成的无规则膜（Faraldo *et al.*，2008）。

在鳞翅目中，参与集结和包囊作用的主要是粒细胞和浆细胞，而果蝇是叶状细胞（Schmidt *et al.*，2001；Vass and Nappi，2001）。在某些昆虫中会同时发生“结”黑化和“囊”黑化的过程，在这些昆虫中，拟绛色细胞或者果蝇中的晶体细胞也往往是集结和包囊的参与者（Stand and Pech，1995）。

在鳞翅目中，粒细胞和浆细胞形成包囊的排列是随机的（Wiegand *et al.*，2000）；但在另外一些昆虫中却是高度有序排列的，先由粒细胞附着到目标上，然后浆细胞也附着上（Lackie *et al.*，1985；Pech and Strand，1996）。包囊 Dowex 1X2 色谱小珠时，大豆夜蛾 *Pseudoplusia includens* 的粒细胞先结合到小珠子上，之后，浆细胞再一个一个的结合上去，形成鞘，直到囊周围的一层单层粒细胞开始出现凋亡，包囊作用也随之进入尾期（Pech and Strand，1996，2000）。其他一些无活性的外来异物被包囊的进程也和 Dowex 1X2 小珠相似，都要粒细胞首先结合到目标，浆细胞随之附着（Lavine and Strand，2001a）。但也有例外，只要将外来异物先在血淋巴中孵育一段时间，浆细胞就能在粒细胞不存在的情况下独自完成包囊的任务（Lavine and Strand，2001a）。

2.2 集结和包囊作用识别受体和调节因子

上述参与吞噬作用的一些受体蛋白，如 TEP1、Ig 超级家族受体、整联蛋白等，也参与了集结和包囊过程的外来异物的识别（Lavine and Strand，2002）。烟草天蛾 *Manduca sexta* 中，除了整联蛋白的 α1 亚基外，又鉴定了 α2 和 α3 亚基，RNA 干扰实验表明，任意一个亚基的丢失都将导致细胞包囊作用的失败（Zhuang *et al.*，2008）。用细菌刺激印度柞蚕 *Antheraea mylitta* 几分钟后，发现有一个新的上调蛋白，将该蛋白相对应的基因敲除后，集结作用明显减少，而血淋巴中的细菌量相应增加，因该蛋白参与了细胞的集结过程，因此命名为“Noduler”。Noduler 能结合到微生物细胞表面的 LPS，LTA 和 β-1，3-葡聚糖，具有昆虫 PRR 的特性，但与 TEP 等不同的是“Noduler”不影响细胞的吞噬作用（Gandhe *et al.*，2007）。此外，一些最初在家蚕 *Bombyx mori* 中分离得到的蛋白，如 β-1,3-葡聚糖识别蛋白（β-1,3- glucans recognition protein）和家蚕多绑定蛋白（*B. mori* multibinding protein）等，也作为识别受体分别参与了昆虫包囊和集结作用（Marmaras and Lampropoulou，2009）。

除了对细菌、真菌等外来物的识别外，昆虫往往还能识别线虫、昆虫的寄生物以及一些不具有生物活性的外来物，如尼龙、乳胶粒、色谱小珠等等，而引发免疫反应。但这些外来物，并不含我们通常说的 PAMP，因此，昆虫的识别范围实际上要广泛很多。但在没有获得性免疫的情况下，昆虫是如何识别这些异物的，Lavine 和 Strand（2002）认为并不是昆虫对不同的异物有不同的受体，而是当受到外物侵染时，昆虫体内的一些自身物质（模式分子等）发生了改变，这一改变使受体对这些模式分子的结合特性也发生了改变，而引发了吞噬、包囊等免疫反应。基膜（basement membrane，BM）存在于昆虫的血腔和内部器官中，正常情况下，血细胞不结合或者很松散地结合在 BM 上。当有异物入侵，引起 BM 破损时，粒细胞等血细胞会通过一些蛋白和 BM 结合，参与 BM 重新合成的过程（Nardi and Miklasz，1989；Kurata *et al.*，1991，1992；Nardi *et al.*，2001），同时在 BM 破损部位，往往有血细胞聚集和包囊的发生（Rizki and Rizki，1980a；Lackie，1988）。对果蝇黑色瘤（melanotic tumor）突变体 *tu-W* 和 *tu*（*l*）Sz^{ts} 的研究也证实了包囊的发生依赖于血

细胞识别了 BM 性状的改变(Rizki and Rizki，1974，1980b)。

但即便是相同的外来异物，不同昆虫免疫反应也不相同：CM-Sephadex 几乎不能被大豆夜蛾 *Pseudoplusia includens* 包囊，但总能被草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 包囊；而对 DEAE-Sepharose 则正好相反，大豆夜蛾对它有很强的包囊作用，而草地贪夜蛾则几乎对它不发生包囊作用(Lavine and Strand，2002)。另外，与昆虫遗传距离越远，种系差距越大的外来入侵物，越容易被识别和包囊(Lackie，1988)。

2.3　集结和包囊作用中粘附态细胞的形成

一旦外来异物被识别，包囊的形成就依赖于将非粘附性的血细胞变成具有粘附性的血细胞。在哺乳动物中，免疫细胞粘附态的形成需要细胞因子、细胞粘附分子、和相对应的受体调节(Baggiolini *et al*.，1997)。在鳞翅目昆虫中，如大豆夜蛾 *P. includens*等，粒细胞或者 PRRs 结合到外来异物的表面后，也促使浆细胞迅速转变为粘附态(Lavine and Strand，2002)。浆细胞扩散肽(plasmatocyte spreading peptide，PSP)被认为是使浆细胞活化具有粘性特征的细胞因子(Clark *et al*.，1997)。当浓度 ≥100 pmol/L 时，不论是合成还是纯化得到的 PSP 都能在几秒之内迅速诱导血细胞集结和粘附在异物表面(Lavine and Strand，2002)。PSP 的同系物在鳞翅目的多种昆虫中被发现，且许多被证实具有活化血细胞的功能(Wang *et al*.，1999；Strand *et al*.，2000)。经前体剪切而得到的成熟 PSP 多肽其结构包括 1 个无规则的 N 端(1～6 个残基)，1 个结构规则且被 1 个二硫键稳定的核心区域，和 1 个短的 β 发卡结构(Volkman *et al*.，1999)。诱导变异发现，不论是无规则的区域还是规则区域，都是保持 PSP 生物活性所必需的(Clark *et al*.，2001a，2001b)。当 PSP 和相应的受体结合后，促使浆细胞细胞质中的粘附分子释放到细胞表面，而产生粘附性(Strand and Clark，1999)。在哺乳动物中，结合 PSP 的受体除了 2.2 中提到的 Ig 超级家族受体、整联蛋白外，还包括钙粘着蛋白(cadherins)和选择蛋白(selections)。在大豆夜蛾 *P. includens* 中，去除整联蛋白的识别序列 Arg-Gly-Asp(RGD)，浆细胞的粘性下降(Lavine and Strand，2001b)。用抗体 M13 进行中和实验，发现烟草天蛾浆细胞表面有了一些未识别的蛋白，但对细胞的聚集和依附到异物表面是必需的(Wiegand *et al*.，2000)。

2.4　酶和化学物质对集结和包囊作用的调节

在黑化反应中所需的一些酶，如多酚氧化酶(phenoloxidase，PO)、多巴脱羧酶(dopa decarboxylase，Ddc)等，在地中海实蝇 *C. capitata* 中证实也是吞噬和包囊过程所需要的。将 Ddc 基因沉默，或用化学物质使其失活，都使大肠杆菌在实蝇体内被黑化、吞噬和包囊作用明显受到阻碍(Sideri *et al*.，2008)。蛋白激酶 A(protein kinase A，PKA)也对大蜡螟 *Galleria mellonella* 幼虫的集结反应有影响，PKA 的抑制剂(Rp-8-Br-cAMPS)能诱导集结反应，而 PKA 的活化剂(Sp-8-Br-cAMPS)作用相反(Brooks and Dunphy，2005)。

激素也影响昆虫的集结作用。在对麻蝇 *Neobellieria bullata* 的 3 龄幼虫注射昆布多糖(laminarin，即为 β-1,3-glucan)前，先分别用 20-羟基蜕皮甾酮(20-hydroxyecdysone)和保幼激素(juvenile hormone)处理，前者能促进昆布多糖引起的集结反应，后者则显著降低了血细胞集结作用的能力(Franssens *et al*.，2006)

此外，研究的比较多的是类二十烷酸(eicosanoids)等化学物质对集结反应的影响。地塞米松(dexamethasone)和奈普生(naproxen)(两者都为类二十烷酸生物合成抑制剂)能显著降低麻蝇 *N. bullata* 3 龄幼虫因注射昆布多糖而引起的集结反应，但这种抑制反应能被类二十烷酸的前体花生四烯酸(arachidonic acid)恢复(Franssens *et al*.，2005)。Miller(2005)认为，地塞米松影响烟草天蛾血细胞的集结反应，是由于影响了浆细胞的伸长作用，但不影响细胞的横向生长，该现象同样能被花生四烯酸恢复。有关类二十烷酸在昆虫血细胞集结作用中的必要性，在很多昆虫中都有研究，包括拟步甲 *Zophobas atratus*(Stanley *et al*.，1998)、十七年蝉 *Magicicada septendecim*(Tunaz *et al*.，1999)、意大利蜜蜂 *Apis mellifera*(Bedick *et al*.，2001)、黄粉蝶 *Colias eurytheme*(Stanley *et al*.，1999)、一星黏虫 *Pseudaletia unipuncta* 和小地老虎 *Agrotis ipsilon*(Stanley-Samuelson *et al*.，1997)等。

3　小结与展望

昆虫免疫的研究不仅与昆虫的病理学和生物防治密切相关，同时也和人类健康的研究和提高密切相关。在脊椎动物中，天生免疫和获得性免疫两个免疫系统是相互交织、相互依赖影响的，因此很难

单独研究其中的一个系统而不考虑另一个的影响(Medzhitov and Janeway, 1999)。而节肢动物和昆虫只受天生免疫系统保护的,便成为了解天生免疫分子机理的理想模式。事实上人类免疫系统中很多重要发现,都来自于对昆虫的研究。如在人类免疫信号传递途径中扮演重要角色的 *Toll* 基因最初是在果蝇中发现的,被认为和果蝇胚胎的背腹轴发育有关(Hashimoto *et al*., 1988),后又证明 *Toll* 和果蝇成虫的天生免疫有关(Lemaitre, *et al*., 1996)。然后又在人等哺乳动物中发现,*Toll* 的同源基因直接影响生物体的抗菌功能;并且现已证明,人体内 *Toll* 基因的同源物不仅和天生免疫相关,也具有调节获得性免疫的功能(Chaudhary *et al*., 1998)。由于昆虫取材相对容易,作用时间短,更常被用来研究与人类疾病相关的基因,如 Spresser 等(2008)利用果蝇的免疫系统研究了人体内的 OTK18 转录抑制子和 HIV-1 感染的关系等。对一些虫媒昆虫如蚊子等的研究更是直接地影响了人类的健康。通过虫媒传播的寄生虫、细菌和病毒在这些昆虫体内都受到极强的天生免疫的抵抗,一旦我们有办法能提高虫媒对这些病原的杀灭作用,必然在很高程度上控制了虫媒引起的传染病的传播。为此目的,我们实验室的工作集中在疟疾和蚊子的相互作用关系上,希望能找到一些在蚊子包囊和黑化寄生虫等外来异物过程中起关键作用的基因。相信随着基因组和蛋白质组技术的提高,对昆虫天生免疫机制的分析也会进一步加快。

参 考 文 献 (References)

Baggiolini M, Dewald B, Moser B, 1997. Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol*., 15: 675 – 677.

Bedick JC, Tunaz H, Nor Aliza AR, Putnam SM, Ellis MD, Stanley DW, 2001. Eicosanoids act in nodulation reactions to bacterial infections in newly emerged adult honey bees, *Apis mellifera*, but not in older foragers. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol*., 130(1): 107 – 117.

Blandin SA, Levashina EA, 2007. Phagocytosis in mosquito immune responses. *Immunol. Rev*., 219(1): 8 – 16.

Borges AR, Santos PN, Furtado AF, Figueiredo RC, 2008. Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduvidae). *Micron*, 39 (4): 486 – 494.

Brooks CL, Dunphy GB, 2005. Protein kinase A affects *Galleria mellonella* (Insecta: Lepidoptera) larval haemocyte non-self responses. *Immunol. Cell Biol*., 83(2): 150 – 159.

Castillo JC, Robertson AE, Strand MR, 2006. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 36(12): 891 – 903.

Chaudhary PM, Ferguson C, Nguyen V, Nguyen O, Massa HF, Eby M, Jasmin A, Trask BJ, Hood L, Nelson PS, 1998. Cloning and characterization of two Toll/Interleukin-1 receptor-like genes TIL3 and TIL4: Evidence for a multi-gene receptor family in humans. *Blood*, 91(11): 4 020 – 4 027.

Christensen BM, Li J, Chen CC, Nappi AJ, 2005. Melanization immune responses in mosquito vectors. *Trends Parasitol*., 21 (4): 192 – 199.

Clark KD, Pech LL, Strand MR, 1997. Isolation and identification of a plasmatocyte-spreading peptide from the hemolymph of the lepidopteran insect *Pseudoplusia includens*. *J. Biol. Chem*., 272 (37): 23 440 – 23 447.

Clark KD, Volkman BF, Thoetiatikal H, Hayakawa Y, Strand MR, 2001a. N-terminal residues of plasmatocyte spreading peptide possess specific determinants required for biological activity. *J. Biol. Chem*., 276(40): 37 431 – 37 435.

Clark KD, Volkman BF, Thoetiatikal H, King HB, Hayakawa Y, Strand MR, 2001b. Alanine-scanning mutagenesis of plasmatocyte spreading peptide identifies critical residues for biological activity. *J. Biol. Chem*., 276(21): 18 491 – 18 496.

Costa SC, Ribeiro C, Girard PA, Zumbihl R, Brehélin M, 2005. Modes of phagocytosis of Gram-positive and Gram-negative bacteria by *Spodoptera littoralis* granular haemocytes. *J. Insect Physiol*., 51(1): 39 – 46.

Dong Y, Taylor HE, Dimopoulos G, 2006. AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* immune system. *PLoS Biol*., 4(7): 1 137 – 1 146.

Faraldo AC, Gregório EA, Lello E, 2008. Morphological and quantitative aspects of nodule formation in hemolymph of the blowfly *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794). *Exp. Parasitol*., 118 (3): 372 – 377.

Foukas LC, Katsoulas HL, Paraskevopoulou N, Metheniti A, Lambropoulou M, Marmaras VJ, 1998. Phagocytosis of *Escherichia coli* by insect hemocytes requires both activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway for attachment and β_3 integrin for internalization. *J. Biol. Chem*., 273 (24): 14 813 – 14 818.

Franssens V, Simonet G, Bronckaers A, Claeys I, De Loof A, Vanden Broeck J, 2005. Eicosanoids mediate the laminarin-induced nodulation response in larvae of the flesh fly, *Neobellieria bullata*. *Arch. Insect Biochem. Physiol*., 59(1): 32 – 41.

Franssens V, Smagghe G, Simonet G, Claeys I, Breugelmans B, De Loof A, Vanden Broeck J, 2006. 20-Hydroxyecdysone and juvenile hormone regulate the laminarin-induced nodulation reaction in larvae of the flesh fly, *Neobellieria bullata*. *Dev. Comp. Immunol*., 30 (9): 735 – 740.

Gandhe AS, John SH, Nagaraju J, 2007. Noduler, a novel immune up-regulated protein mediates nodulation response in insects. *J. Immunol*., 179(10): 6 943 – 6 951.

Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV, 1988. The *Toll* gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears

to encode a transmembrane protein. *Cell*, 52: 269 – 279.

Hillyer JF, Christensen BM, 2002. Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Histochem. Cell Biol.*, 117 (5): 431 – 440.

Hillyer JF, Schmidt SL, Christensen BM, 2003a. Hemocyte-mediated hagocytosis and melanization in the mosquito *Armigeres subalbatus* following immune challenge by bacteria. *Cell Tissue Res.*, 313(1): 117 – 127.

Hillyer JF, Schmidt SL, Christensen BM, 2003b. Rapid phagocytosis and melanization of bacteria and *Plasmodium* sporozoites by hemocytes of the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Parasitol.*, 89(1): 62 – 69.

Hillyer JF, Schmidt SL, Christensen BM, 2004. The antibacterial innate immune response by the mosquito *Aedes aegypti* is mediated by hemocytes and independent of Gram type and pathogenicity. *Microbes Infect.*, 6(5): 448 – 459.

Hoffmann JA, 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature*, 426 (6 962): 33 – 38.

Hynes RO, Zhao Q, 2000. The evolution of cell adhesion. *J. Cell Biol.*, 150(2): 89 – 95.

Kind TV, 2005. Agglutination and phagocytosis of foreign abiotic particles by hemocytes of the blowfly, *Calliphora vicina in vivo*. I. Dynamics of hemocyte activity during larval development. *Tsitologiia*, 47(7): 609 – 622.

Kocks C, Cho JH, Nehme N, Ulvila J, Pearson AM, Meister M, Strom C, Conto SL, Hetru C, Stuart LM, Stehle T, Hoffmann JA, Reichhart JM, Ferrandon D, Rämet M, Ezekowitz RA, 2005. Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell*, 123(2): 335 – 346.

Kurata S, Kobayashi H, Natori S, 1991. Participation of a 200-kDa hemocyte membrane protein in the dissociation of the fat body at the metamorphosis of *Sarcophaga*. *Dev. Biol.*, 146(1): 179 – 185.

Kurata S, Saito H, Natori S, 1992. The 29-kDa hemocyte proteinase dissociates fat body at metamorphosis of *Sarcophaga*. *Dev. Biol.*, 153(1): 115 – 121.

Lackie AM, 1988. Haemocyte behaviour. *Adv. Insect Physiol.*, 21: 85 – 178.

Lackie AM, Takle G, Tetley L, 1985. Haemocytic encapsulation in the locust *Schistocerca gregaria* (Orthoptera) and in the cockroach *Periplaneta americana* (Dictyoptera). *Cell Tiss. Res.*, 240(2): 343 – 351.

Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M, 2001. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, 230(2): 243 – 257.

Lavine MD, Strand MR, 2001a. Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudoplusia includens*. *J. Insect Physiol.*, 47(9), 965 – 974.

Lavine MD, Strand MR, 2001b. α-Integrin subunits expressed in hemocytes of *Pseudoplusia includens*. In: Keystone Symposium on the Genetic Manipulation of Insects. Keystone Symposia, Silverthorne, CO. 63.

Lavine MD, Strand MR, 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(10): 1 295 – 1 309.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA, 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86: 973 – 983.

Levashina EA, Moita LF, Blandin S, Vriend G, Lagueux M, Kafatos FC, 2001. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell*, 104(5): 709 – 718.

Ling E, Shirai K, Kanekatsu R, Kiguchi K, 2005. Hemocyte differentiation in the hematopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*: Prohemocytes have the function of phagocytosis. *Cell Tissue Res.*, 320(3): 535 – 543.

Marmaras VJ, Lampropoulou M, 2009. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cell Signal*, 21(2): 186 – 195.

Medzhitov R, Janeway CA Jr, 1999. Innate immune induction of the adaptive immune response. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 64: 429 – 435.

Miller JS, 2005. Eicosanoids influence *in vitro* elongation of plasmatocytes from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 59(1): 42 – 51.

Moita LF, Vriend G, Mahairaki V, Louis C, Kafatos FC, 2006. Integrins of *Anopheles gambiae* and a putative role of a new beta integrin, BINT2, in phagocytosis of *E. coli*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36(4): 282 – 290.

Moita LF, Wang-Sattler R, Michel K, Zimmermann T, Blandin S, Levashina EA, Kafatos FC, 2005. *In vivo* identification of novel regulators and conserved pathways of phagocytosis in *A. gambiae*. *Immunity*, 23(1): 65 – 73.

Nardi JB, Gao C, Kanost MR, 2001. The extracellular matrix protein lacunin is expressed by a subset of hemoctyes involved in basal lamina morphogenesis. *J. Insect Physiol.*, 47(9): 997 – 1 006.

Nardi JB, Miklasz SD, 1989. Hemocytes contribute to both the formation and breakdown of the basal lamina in developing wings of *Manduca sexta*. *Tissue and Cell*, 21(4): 559 – 567.

Pech LL, Strand MR, 1996. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *J. Cell Sci.*, 109: 2 053 – 2 060.

Pech LL, Strand MR, 2000. Plasmatocytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells. *J. Insect Physiol.*, 46 (12): 1 565 – 1 573.

Ratcliffe NA, Gagen SJ, 1976. Cellular defense reactions of insect hemocytes *in vivo*: Nodule formation and development in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae. *J. Invert. Pathol.*, 28(3): 373 – 382.

Ratcliffe NA, Gagen SJ, 1977. Studies on the *in vivo* cellular reactions of insects: an ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. *Tissue and Cell*, 9(1): 73 – 85.

Relman D, Tuomanen E, Falkow S, Golenbock DT, Saukkonen K, Wright SD, 1990. Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: Macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell*, 61(7): 1 375 – 1 382.

Rizki RM, Rizki TM, 1974. Basement membrane abnormalities in melanotic tumor formation of *Drosophila*. *Experientia*, 30(5): 543 – 546.

Rizki RM, Rizki TM, 1980a. Hemocyte responses to implanted tissues in *Drosophila melanogaster* larvae. *Wilhelm Roux's Arch*., 189: 207 – 213.

Rizki RM, Rizki TM, 1980b. Developmental analysis of a temperature-sensitive melanotic tumor mutant in *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Arch*., 189: 197 – 206.

Rämet M, Manfruelli P, Pearson A, Mathey-Prevot B, Ezekowitz RA, 2002. Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature*, 416(6 881): 644 – 648.

Rämet M, Pearson A, Manfruelli P, Li X, Koziel H, Göbel V, Chung E, Krieger M, Ezekowitz RA, 2001. *Drosophila* scavenger receptor CI is a pattern recognition receptor for bacteria. *Immunity*, 15(6): 1 027 – 1 038.

Schmidt O, Theopold U, Strand M, 2001. Innate immunity and evasion by insect parasitoids. *BioEssays*, 23(4): 344 – 351.

Sideri M, Tsakas S, Markoutsa E, Lampropoulou M, Marmaras VJ, 2008. Innate immunity in insects: Surface-associated dopa decarboxylase-dependent pathways regulate phagocytosis, nodulation and melanization in medfly haemocytes. *Immunology*, 123(4): 528 – 537.

Spresser CR, Marshall SE, Carlson KA, 2008. Characterization of gene expression regulated by human OTK18 using *Drosophila melanogaster* as a model system for innate immunity. *J. Genet*., 87(2): 109 – 117.

Stanley DW, Hoback WW, Bedick JC, Tunaz H, Rana RL, Nor Aliza AR, Miller JS, 1999. Eicosanoids mediate nodulation reactions to bacterial infections in larvae of the butterfly, *Colias eurytheme*. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol*., 123(3): 217 – 223.

Stanley DW, Miller JS, Howard RW, 1998. The influence of bacterial species and intensity of infections on nodule formation in insects. *J Insect Physiol*., 44(2): 157 – 164.

Stanley-Samuelson D, Rana RL, Pedibhotla VK, Miller JS, Jurenka RA, 1997. Eicosanoids mediate microaggregation and nodulation responses to bacterial infections in black cutworms, *Agrotis ipsilon*, and true armyworms, *Pseudaletia unipuncta*. *J. Insect Physiol*., 43(2): 125 – 133.

Strand MR, Clark KD, 1999. Plasmatocyte spreading peptide induces spreading of plasmatocytes but represses spreading of granulocytes. *Arch. Insect Biochem. Physiol*., 42(3): 213 – 223.

Strand MR, Hayakawa Y, Clark KD, 2000. Plasmatocyte spreading peptide (PSP1) and growth blocking peptide (GBP) are multifunctional homologs. *J. Insect Physiol*., 46(5): 817 – 824.

Strand MR, Pech LL, 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annu. Rev. Entomol*., 40: 31 – 56.

Strand MR, 2008. The insect cellular immune response. *Insect Science*, 15: 1 – 14.

Stroschein-Stevenson SL, Foley E, O'Farrell PH, Johnson AD, 2006. Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans*. *PloS. Biol*., 4(1): 88 – 99.

Swanson JA, Baer SC, 1995. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol*., 5(3): 89 – 93.

Söderhäll K, Cerenius L, 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol*., 10(1): 23 – 28.

Theopold U, Li D, Fabbri M, Scherfer C, Schmidt O, 2002. The coagulation of insect hemolymph. *Cell Mol. Life Sci*., 59(2): 363 – 372.

Tunaz H, Bedick JC, Miller JS, Hoback WW, Rana RL, Stanley DW, 1999. Eicosanoids mediate nodulation reactions to bacterial infections in adults of two 17-year periodical cicadas, *Magicicada septendecim* and *M. cassini*. *J. Insect Physiol*., 45(10): 923 – 931.

Vass E, Nappi AJ, 2001. Fruit fly immunity. *BioEssays*, 51: 529 – 535.

Volkman BJ, Anderson ME, Clark KD, Hayakawa Y, Strand MR, Markley JL, 1999. Structure of the insect cytokine plasmatocyte spreading peptide from *Pseudoplusia includens*. *J. Biol. Chem*., 274: 4 493 – 4 496.

Wang Y, Jiang H, Kanost MR, 1999. Biological activity of *Manduca sexta* paralytic and plasmatocyte spreading peptide and primary structure of its hemolymph precursor. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 29: 1 075 – 1 086.

Watson FL, Püttmann-Holgado R, Thomas F, Lamar DL, Hughes M, Kondo M, Rebel VI, Schmucker D, 2005. Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science*, 309: 1 874 – 1 878.

Wiegand C, Levin D, Gillespie JP, Willott E, Kanost MR, Trenczek T, 2000. Monoclonal antibody M13 identifies a plasmatocyte membrane protein and inhibits encapsulation and spreading reactions of *Manduca sexta* hemocytes. *Arch. Insect Biochem. Physiol*., 45: 95 – 108.

Williams MJ, 2007. *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *J. Immunol*., 178(8): 4 711 – 4 716.

Zhuang S, Kelo L, Nardi JB, Kanost MR, 2008. Multiple alpha subunits of integrin are involved in cell-mediated responses of the *Manduca* immune system. *Dev. Comp. Immunol*., 32(4): 365 – 379.

（责任编辑：赵利辉）